

## 牛结核分枝杆菌荧光 PCR 检测试剂说明书

Method of the real-time PCR for tuberculosis pathogenic organisms

(50 reactions)

### 1、试剂盒简介

货号：HB-207-1

本试剂盒是根据国标 GB/T27639-2011《结核病病原菌实时荧光 PCR 检测方法》推荐的以牛结核分枝杆菌特异的基因序列为模板设计的引物探针生产，探针的 5'端和 3'端分别标记不同的荧光素，5'端标记 FAM 荧光素，3'端是 BHQ1 修饰。

### 2、试剂盒组成

试剂盒具体组成参见表 1：

表 1：试剂盒组成 (50test/盒)

试剂盒组成成分	体积
核酸扩增试剂：	
DEPC 水	1ml × 1 管
牛结核荧光 PCR 反应液	750μL × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	30μL × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
牛结核荧光阳性对照	1ml × 1 管

(注：样品推荐使用提取核酸更快捷方便的纳米磁珠法或者其他等效核酸提取方法)

### 3、样本采集, 存放及运输

3.1 样本采集：所用取样器材必须经高压灭菌并烘干。

用于检测多种样本（如患病动物的培养物、血样、奶样、粪便、组织等）中细菌的 DNA，具体详见 GB/T27639-2011《结核病病原菌实时荧光 PCR 检测方法》。

3.2 存放：样品应尽快研磨提取核酸进行检测，-70 °C 以下可长期保存，但应避免反复冻融。

3.3 运输：采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

### 4、荧光 PCR 检测

#### 4.1 操作方法

4.1.1 样本的处理（在样本制备区进行）：详见具体核酸提取试剂盒说明书。【推荐使用纳米磁珠法或者《《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》》，更方便快捷高效提取核酸】。

#### 4.1.2 检测

4.1.2.1 扩增试剂准备（在反应混合物配制区进行）：

从试剂盒中取出相应的荧光 PCR 反应液、Taq 酶，2000×g 离心 5 秒钟。每个样品测试反应体系配制见下表 2。

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	荧光 PCR 反应液	Taq 酶
用量	15 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L

#### 4.1.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个荧光 PCR 管孔中各分装 15  $\mu$ L 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10  $\mu$ L，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。（阳性对照不需要提取核酸，可以直接吹打混匀后吸取当模板）

#### 4.1.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，94 $^{\circ}$ C/2 min；

第二阶段，94 $^{\circ}$ C/10 sec，60  $^{\circ}$ C/45 sec，40个循环，在第二阶段每次循环的退火延伸时收集荧光。试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

## 4.2 结果判定

**4.2.1 结果分析条件的设定** 阈值设定原则：根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。对于多通道荧光 PCR 仪，选定 FAM(465-510)检测通道读取检测结果，ABI 仪器选择 5' FAM；3' BHQ1 淬灭基团。

### 4.2.2 质控标准

- 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。
- 阳性对照的 Ct 值应小于等于 35，并出现典型的扩增曲线。
- 如阴性和阳性对照不满足以上条件，此次实验视为无效。

### 4.2.3 结果判定

- 阴性：无 Ct 值，且无特征性扩增曲线，表明样品为牛结核分枝杆菌核酸阴性。
- 阳性：Ct 值 $\leq$ 35.0，且出现典型的扩增曲线，表示样品为阳性，含有牛结核分枝杆菌核酸。

#### 【注意事项】

- 实验室应至少分三个区：样品处理区、反应混合物配制区和检测区。
- 各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染。检测结束后，应立即对工作台进行清洁。
- 分装反应液时，应尽量避免产生气泡。上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
- 阳性对照在吸取前应在微量漩涡振荡器上剧烈振荡 1~2 秒。
- 试剂盒中各组分应避免反复冻融。

【规格】 50 份/盒

【贮藏与有效期】 荧光 PCR 检测试剂盒-20 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 12 个月；《病毒基因组 DNA/RNA 离心柱型提取试剂盒》室温保存。

## 5、序列信息

牛分枝杆菌上游引物：ACGCCTTCCTAACCAGAATTG

牛分枝杆菌下游引物：GGCTATTGACCAGCTAAGATATCC

牛分枝杆菌-探针 P：AATTCATACAAGCCGTAGTCGTGCAGAA